Overexpression of Ice Recrystallization Inhibition Protein (*HvIRIP*) from Barley Enhances Cold Tolerance in Transgenic rapeseed plants

Kyung Hee Roh* · Jong-Sug Park · Han-Chul Kang · Jong-Bum Kim · Young-Suk Jang · Kwang-Soo Kim · Hankuil Yi

HvIRIP 과발현 유채 형질전환체의 내한성 증진

노경희* · 박종석 · 강한철 · 김종범 · 장영석 · 김광수 · 이한길

Received: 17 July 2015 / Accepted: 26 August 2015 / Published Online: 31 December 2015

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2015

Abstract Rapeseed (*Brassica napus*) is now the second largest oilseed crop after soybean. Cold temperature tolerance is an important agronomic trait in winter rapeseed that determines the plant's ability to control below freezing temperatures. To improve cold tolerance of rapeseed plants, an expression vector containing an Barley Ice recrystallization inhibition protein (*HvIRIP*) cDNA driven by a cauliflower mosaic virus 35S promoter was transferred into rapeseed plants. Transgenic expression of *HvIRIP* was proved by southern- and northern-blot analyses. The level of freezing tolerance of transgenic T₃ plants was found to be significantly greater than that of wild-type rapeseed plants by freezing assay. Proline accumulation during cold stress was also highly induced in the transgenic rapeseed plants. The transgenic plants exhibited considerable tolerance against oxidative damage induced by cold stress. Our results indicated that heterologous *HvIRIP* expression

in transgenic rapeseed plants may induce several oxidative-stress responsive genes to protect from cold stress.

Keywords antioxidant enzyme activity · *Brassica napus* · cold tolerance · *HvIRIP* · ice recrystallization inhibition protein · rapeseed

서 론

유채(*Brassica napus* L.)는 배추과에 속하는 유식작물로서 종자 내 지방산 함량이 약 35–45%로 높고, 지방산 조성 중 바이오 디젤 원료로 가장 좋은 올레인산(C18:1) 함량이 약 60–70% 함유되어 있는 고 올레인산 계통과 화장품 원료로 고부가가치를 갖는 에루진산(C22:1) 함량이 약 40–50% 함유되어 있는 고 에루진산 계통이 있어 상업적 이용 가치가 매우 높은 작물이다(Booth와 Gunstone, 2004). 국내에서 유채는 추파재배로 이루어지고 있는데, 월동성이 약해 남부지역에서만 재배가 가능한 실정으로 재배면적을 확대하기 위해서는 내한성이 증진된 품종 개발이 필요하다.

식물체내 동결(freezing)현상을 이겨내기 위해서는 동결-회피(freeze-avoidance)하거나 동결-내성(freeze-tolerance)이 있어야 한다. 동결-회피식물은 주로 결빙방지물질을 생성해 빙점을 낮추거나 또는 얼 수 있는 물의 함량이 최소화 된 종자형태로 월동을 한다. 동결-내성식물은 세포밖(extracellular)에 형성된 얼음을 이겨내거나 또는 세포내(intracellular) 얼음이 형성되지 않도록 하는 내동성을 가진다(Zamecnik과 Janacek, 1992). 최근에는 월동기 저온 순화과정에서 apoplast에 축적되는 특수 단백질인 결빙방지단백질(antifreezing proteins; AFPs)에 관한 연구가 활발히 진행 중이다(Atici와 Nalbantoğlu, 2003; Moffatt 등, 2006). 지금까지 알려진 바에 의하면 식물 조직내에서 AFPs는 얼음결정

K. H. Roh · J.-S. Park · H.-C. Kang · J.-B. Kim
Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Jeonju 560-500, Republic of Korea

Y.-S. Jang · K.-S. Kim
Bioenergy Crop Research Institute, National Institute of Crop Science, RDA, Muan 534-833, Republic of Korea

H. Yi
Department of Biological Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

*Corresponding author (K. H. Roh: rohkh@korea.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

체를 흡수하여 얼음과 얼음끼리 결합하여 더 큰 얼음 결정체를 만드는 것을 방지하는 ice recrystallization inhibition activity를 가지고 있다(Knight와 Duman, 1986; John 등, 2009). 또한 얼음 결정을 흡착하는 AFPs는 얼음 결정의 녹는 온도에 영향을 주기 보다는 얼음 결정이 생성되는 온도를 낮추게 하며, 결과적으로 저온 순화 과정에서 식물체의 AFPs가 증가되면 식물체의 내동성이 증가된다(DeVries, 1986).

Hightower 등(1991)은 AFPs인 *afa3* 유전자를 담배와 토마토에 전이하여 형질전환하고 식물체 잎에서 얼음결정체를 방지하는 antifreeze activity가 있음을 최초로 보고한 바 있다. 라이그라스에서 분리한 *IRIP* (ice recrystallization inhibition protein) 유전자는 AFPs로 잘 알려져 있으며, 이 유전자가 형질전환된 애기장대에서 내동성을 증진시키는 결과를 나타냈다(Fei, 2008). Meyer 등(1999)은 당근에서 Leucine-rich repeat (LRRs) domain을 갖는 단백질을 분리하여 내동성 기능을 입증한 바 있으며, Tremblay 등(2005)은 밀에서 2종의 *IRIP* (*TalIRIP-1*, *TalIRIP-2*)을 분리하여 분석한 결과 N-terminal 부분에 LRRs domain이 있고, 이 domain은 protein kinase receptor를 가지고 있고, C-terminal에는 다른 AFP와 마찬가지로 ice-binding domain을 가지고 있음을 보고하였다.

본 연구에서는 국내 육성 동보리에서 *HvIRIP*를 분리하여 전신발현 *CaMV35S* 프로모터 조절하에 발현될 수 있도록 식물형질전환용 운반체를 제작하였고 아그로박테리움을 이용하여 유체에 형질전환하였다. 여기에서 생산된 유체 형질전환체를 대상으로 Freezing assay 및 저온 스트레스 관련 효소 활성 검정 실험 등을 통해 *HvIRIP* 유전자가 유체의 내한성을 증진시키는 것을 확인하였다.

재료 및 방법

식물재료. 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 육성한 고정종(OP; Open pollination)인 ‘영산유채’를 분양받아 실험에 사용하였다.

***HvIRIP* 유전자 분리 및 형질전환용 운반체 제작.** 보리 (*Hordeum vulgare*)의 어린 유묘를 저온(4°C 또는 영하 10°C)에서 시간별로 처리된 잎을 채취하여 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 그리고 cDNA synthesis kit (Takara, Japan)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. *HvIRIP* 유전자는 Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) Gene Index Databases에 있는 TC131871 클론의 염기서열정보를 이용하여 Polymerase chain reaction (PCR)반응을 통해 분리하였다. 이때 PCR 50 µL 반응액에는 보리 cDNA (영하 10°C에서 30분간 처리) 50 ng, Taq DNA polymerase(Takara) 5 unit, Forward primer 1 pmole, Reverse primer 1 pmole, dNTP 등 0.2 mM, 1X PCR buffer (Mg²⁺ plus)가 첨가되었다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 denaturation을 시켰고, 주형 DNA에 primer가 붙는 온도는 60°C로 설정하여 30초간 반응이 일어나도록 한 후, DNA 합성은 72°C에서 1분간 반응시켰으며, DNA 단편의 증폭을 위해 30 cycle로 반응시켰다. 그리고 마지막 3'-말단에 A tail 생성을 위해 72°C에서 10분간 반응하였다. 이 때, 사용한 프라이머 염기서열은 다음과 같다; *HvIRIP-F*; 5'-ATGG CGAAATGCGGGCTGCTG-3', *HvIRIP-R*; 5'-TCATGCATCTC CTACGACTTT-3'. 얻어진 DNA 단편은 TOPO® TA Cloning Kit

(Invitrogen, USA)를 이용하여 TA vector에 들어가게 한 후, Sequencing을 거쳐 858 bp에 해당하는 *HvIRIP* 유전자 염기서열을 획득하여 GenBank에 등록번호 EU887261를 부여 받아 등록하였다. 이렇게 얻어진 *HvIRIP* 유전자는 *NcoI*과 *NotI* 제한효소인식 염기서열이 부착된 후, 이 두개의 제한효소를 이용하여 *CaMV35S* 프로모터의 조절을 받도록 클로닝 되었다. 최종적으로 식물형질전환용 운반체를 만들기 위해 *HvIRIP* 유전자 expression cassette는 *EcoRI*과 *XbaI*을 이용하여 pCambia3300 벡터내로 클로닝되었다.

유체 형질전환. 종자를 70% 에탄올에 4분간 침지한 후, 1.3% 치아염소산나트륨(NaClO) 용액을 넣고 30분간 소독한다. 멸균수로 5번 세척한 다음, 멸균된 여과지 위에 종자를 올려 놓고 수분을 제거한다. 멸균된 종자는 MS배지(Murashige와 Skoog, 1962)에 치상하였고, 재료는 25±1°C가 유지되는 배양실에서 3일간 암배양 한 후 2일간 명배양 조건에서 육성하였다. 유체 형질전환은 기존에 보고된 방법(Roh 등, 2011)에 준하여 실시하였다. 간략하게 서술하자면, 자엽 부착 잎자루(Cotyledonary petiole)를 절단하여 식물형질전환용 운반체가 들어간 아그로박테리움 EHA105 균주 농도가 Optical Distance 값이 0.5가 되도록 조절한 후 접종하였다. 2일간의 공동배양(25±1°C, 암배양)을 거쳐 선발배지에서 캘러스를 거쳐 유기된 재분화된 줄기는 MS 기본배지로 옮겨져 뿌리를 유기하였다. 뿌리가 유기된 유묘는 순화과정을 거쳐 원예용 상토가 담긴 원형포트로 이식되어져 온실에서 재배하였다.

Southern 분석. 유체 형질전환체 잎 1 g을 갈아 Genomic DNA Extraction Kit (Qiagen, USA)를 이용하여 게놈 DNA를 분리하여 제한효소 *XbaI*으로 절단한 후 0.8% 아가로스 젤에서 전기영동하였다. 알칼리 전이방법으로 DNA를 나일론 막(Amersham, UK)에 옮긴 다음 방사선 동위원소로 표지된 *HvIRIP* 유전자를 Probe로 이용하여 혼성화 반응을 65°C에서 하였다(Roh 등, 2011).

Northern 분석. 유체 형질전환체 유묘(본엽 5-6매 전개)를 저온 처리(4°C 및 영하 -3°C)를 한 후 잎 0.1 g을 갈아 Trizol (Invitrogen, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. Total RNA 10 µg을 샘플버퍼(2.2 M formaldehyde, 50% formamide, 0.5X MOPS)에 넣고 65°C에서 10분간 처리한 후, 1.5% (W/V) Formaldehyde 아가로스 젤에서 전기영동하였다. Sodium citrate (20X SSC) 버퍼를 이용하여 RNA를 나일론 막(Amersham)에 옮긴 다음 방사선 동위원소로 표지된 *HvIRIP* 유전자를 Probe로 이용하여 혼성화 반응을 65°C에서 하였다.

Freezing assay. 본엽 4매 전개시 유묘를 4°C에서 2주간 전처리를 하고 1시간에 1°C씩 온도를 떨어뜨리며 영하 5°C까지 온도를 조절하였다. 영하 5°C에서 2일간 처리 한 후 1시간에 1°C씩 온도를 올리며 4°C까지 온도를 조절하였다. 4°C에서 1일간 적응시킨 후 온실로 옮겨 생존여부를 관찰하였다. 이 때, 4°C 처리는 Cold room (15 m² 크기)에서 실시되었고, Freezing 처리는 온도조절을 프로그래밍화 할 수 있는 Phytotron Chamber (Dasol Scientific co., Korea)에서 실시하였다. 모든 처리는 16 시간 명배양(~12,000 Lux) 조건에서 실시되었다.

Proline 함량측정. 본엽 6매 전개시 유묘를 온도처리별로 시료 채취하였으며, Proline 함량은 Colorimetric assay 방법에 의해 측정했다(Bates, 1973). 시료 0.1 g은 액체질소로 넣고 잘 갈은 다음, 3% Sulfosalicylic acid을 2 mL를 첨가하여 단백질을 추출하였다. Whatman No. 2 filter paper에 걸러낸 후, 여과물 1 mL

을 유리시험관에 넣고, 여기에 Acid-ninhydrin solution 1 mL과 Glacial acetic acid 1 mL를 넣고 잘 흔든 뒤, 100°C가 유지되는 항온수조 또는 가열기에서 1시간 반응시킨 후, 얼음에 넣어 반응을 끝냈다. 식힌 후 Toluene 2 mL을 첨가한 후, 잘 흔들어 준 뒤, 상등액 1 mL을 Cuvette에 옮긴 후, Spectrophotometer (Genesys20, Cole-Parmer, USA) 520 nm에서 측정하였다.

총당함량 측정. 본엽 6매 전개시 유묘를 온도처리별로 시료 채취하였으며, 총당 함량은 Anthrone을 이용하여 측정했다(Yemm과 Willis, 1954; Chow와 Landhuser, 2004). 시료 0.1 g을 액체질소로 잘 간 후 아세톤 5 mL을 넣고 흔들어 준 뒤, 원심분리(4,500 rpm, 10분) 한 후, 색소가 추출된 상등액은 버린다. 갈려진 시료가 남은 유리튜브에 80% 에탄올 5 mL을 넣고 잘 흔들어 준 뒤, 95°C에서 10분간 반응한 뒤 원심분리(4,500 rpm, 10분)한 후, 상등액을 200 µL에 차가운 Anthrone reagent 1 mL을 첨가한 후, 100에서 정확히 11분간 반응한 후 재빨리 꺼내서 얼음에 꽂아둔다. Spectrophotometer (Genesys20, Cole-Parmer) 630 nm에서 측정한다.

항산화효소 활성 측정. 본엽 6매 전개시 유묘를 온도처리별로 시료 채취하였으며, 시료 0.1 g을 액체질소로 잘 간 후 효소 활성을 측정하였다. Catalase (CAT) 활성은 Catalase Assay Kit (Calbiochem, Germany)을 이용하여 측정하였다. 이때, 표준물질로 Formaldehydes를 사용하였다. Superoxide dismutase (SOD) 활성은 SOD assay kit (BioViosn, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때, 표준물질로 bovine erythrocyte SOD (Cu/Zn)을 사용하였다. Alcohol dehydrogenase (ADH) 활성은 ADH assay kit (BioViosn)를 이용하여 측정하였다. 이때, 표준물질로 Nicotinamide adenine dinucleotide를 사용하였다.

결 과

보리에서 HvIRIP 유전자 발현양상. 보리 유묘의 저온처리에 따른 HvIRIP 유전자의 발현양상을 살펴본 결과, 4°C에서 24시간 처리하였을 때 HvIRIP 유전자의 발현이 시작되어 처리시간이 길어질수록 발현양이 점차 증가하는 것을 알 수 있었으며, 흥미롭게도 영하 10°C에서 30분간 처리하였을 때 발현양이 가장 많았고, 이 후에는 점차 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이 결과는 HvIRIP 유전자가 저온과 밀접한 관계가 있음을 보여주며, 특히 결빙이 발생하는 영하의 온도에서도 유전자가 지속적으로 발현됨을 있었다. 이와 유사하게 Chew 등(2012)은 남극 쉼새풀(*Deschampsia antarctica*)의 내동성 메커니즘을 밝히는 과정에서 저온에 노출되는 시간이 길면 길수록 *DalRIP* 유전자의 발현양이 크게 증가하는 것을 보고하였다.

HvIRIP 유전자 분리 및 식물형질전환용 운반체 제작. DFCI Gene Index Database에 등록되어 있는 TC131871 클론의 염기

Fig. 1 Expression pattern analysis under low temperature stress of *HvIRIP* gene in *H. vulgare* leaf.

서열정보를 이용하여 *HvIRIP* 유전자의 Open reading frame을 분리하여 858 bp에 해당하는 염기서열을 GenBank에 Accetion number EU887261를 부여받아 등록하였다. 분리한 *HvIRIP* 유전자는 *CaMV35S* 프로모터의 조절하에서 전신에서 발현이 되도록 클로닝되었으며, Phosphinothricin에 저항성을 갖는 *Bar* 유전자가 함께 발현되는 식물형질전환용 운반체를 제작하였다(Fig. 2).

유체 형질전환체 생산 및 Southern 분석. 아그로박테리움을 이용하여 *HvIRIP* 유전자가 유체 게놈 DNA 안으로 들어가 새로운 형질을 획득할 수 있도록 하기 위해 형질전환 실험을 실시하였다(Fig. 3). 균 접종이 끝난 잎자루가 달린 자엽은 선발배지에서 2주정도 경과하면 하얗게 말라 죽어가면서 상처가 난 잎자루 부위의 끝에서 초록색의 캘러스가 발생하기 시작하는 것이 관찰되었고(Fig. 3A, B), 2주마다 계대배양을 하면서 초록색의 캘러스가 점점 커지면서 길이 단단한 배발생 캘러스(embryogenic callus)가 형성되고, 여기에서 줄기가 유기되었다(Fig. 3C). 잎이 커지고 줄기 정단부의 생장점 부위가 명확하게 보이면 줄기를 잘라서 MS 배지에 옮겨 뿌리를 유기하여 완전한 재분화 식물체를 생산한 후(Fig. 3D), 외부 습도에 적응할 수 있도록 순화과정을 거쳐 포트에 이식되어 온실에서 재배하였다(Fig. 3E). 형질전환된 유체 식물체는 온실 이식 후 1주일 후에 4°C가 유지되고 광이 16시간 조사되는 저온배양실로 옮겨져 6주간 춘화처리과정을 거친 후 온실에서 재배되었다. 추대가 올라와 개화가 시작되고 결과적으로 종자 수확에 이르기까지 정상적인 생육을 보였다(Fig. 3F). 이렇게 생산된 유체 형질전환체는 유전자 고정 및 계통 육성을 위해 국립식량과학원 바이오에너지작물센터내 유체 유전자변형식물체 전용 온실에서 후대 증식이 이루어졌다(Fig. 3G).

유체 형질전환체의 게놈 DNA 안에 존재하는 *HvIRIP* 유전자의 copy 수를 알아보기 위해 *HvIRIP* 유전자를 탐침(probe)으로 사용하여 Southern 분석을 하였다(Fig. 4). *HvIRIP* 유전자가 들어간 형질전환체는 5개체(1번-5번)임을 확인하였다. 이 중 형질전환체 1번은 약 5개의 *HvIRIP* 유전자 들어간 multi-copy line이었고, 형질전환체 2번은 적어도 2개의 *HvIRIP* 유전자가

Fig. 2 Construction of plant expression vector. The 858 bp of *HvIRIP* (Genbank EU887261) is driven by the *CaMV* 35S promoter. Arrows indicate the direction of transcription. P35S: *CaMV* 35S promoter; Bar: *Phosphinothricin acetyltransferase*; Ti7: Terminator of *Agrobacterium tumefaciens* gene encoding 'transcript 7' mRNA for a protein with unknown; T35S: *CaMV* 35S 3' UTR terminator; LB: Left border; RB: Right border.

Fig. 3 Production of transgenic rapeseed plants harboring the *HvIRIP* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. (A) Callus initiated at the cut edge of the cotyledon explants after 2 weeks of culture (B) Callus induction after 4 weeks of culture (C) Shoot formation from callus (D) Root formation (E) Transplantation of the plantlet into the pot (F) Normal growth showing the flowering and seed maturation (G) Cultivation of T_2 lines under the greenhouse.

Fig. 4 Genomic Southern blot analysis of transgenic rapeseed plants harboring the *HvIRIP* gene. Genomic DNA was isolated from the T_1 lines and non-transgenic plant (WT), digested with *Xba*I and hybridized to a 0.8 kb fragment of the *HvIRI* cDNA gene fragment. Size markers are indicated on the left. Arrow indicates the band of endogenous gene having high similarity with *HvIRI* gene used as probe. Kb, Kilobase; WT, wild type as negative control; P, pCambia3300-HvIRI expression vector as positive control.

들어간 것으로 보여지며, 형질전환체 3번과 5번은 동일한 클러스터에서 유래한 것으로 보여지며, *HvIRIP* 유전자가 2 copy 존재하는데, 이 중 1개는 크기가 2 kb로, 이는 형질전환 운반체의 Border sequence 안쪽에 위치해 있고 식물체 게놈 DNA 안으로 이동해 들어가는 부위인 4 kb보다 작다. 따라서 2 copy 중 1 copy는 일부분만 들어간 것으로 판단되었다. 즉, 형질전환체 3번과 5번은 동일 개체로 정상적으로 발현되는 *HvIRIP* 유전자

Fig. 5 Northern blot analysis under low temperature stress of *HvIRIP* gene in transgenic rapeseed leaf. Total RNA was isolated from the T_3 lines. Plants were incubated at 4°C for 2 weeks (1), or -3°C for 2 h (2), or -3°C for 6 h (3), or -3°C for 22 h (4) under 16 h illumination. *18S rRNA* was used as constitutively expressed control.

가 1 copy 들어간 개체로 생각된다. 형질전환체 4번은 *HvIRIP* 유전자가 3-copy 들어간 개체로 확인되었다.

유채 형질전환체에서 Northern 분석. 저온 처리에 따른 유채 형질전환체에서의 *HvIRIP* 유전자의 발현양상을 살펴본 결과(Fig. 5), 4°C에서 2주간 처리구에서 *HvIRIP* 유전자의 발현양이 매우 크게 증대되었음을 알 수 있었고, 상온에서 저온 순화 과정 없이 -3°C 처리 되었을 때 *HvIRIP* 유전자의 발현양은 매우 적고, 처리 시간이 길어짐에 따라 *HvIRIP* 유전자의 발현양이 다소 증가하는 경향을 보였다.

Freezing assay. *HvIRIP* 유전자 발현에 의한 유채 형질전환체의 내한성 증진 여부를 알아보기 위해 저온처리 후 생존 유무를 관찰하였다(Fig. 6). Freezing assay 를 하기 위해서 적정 온도 조건을 알아본 결과 영하 5°C에서 대조구가 모두 죽는 것이 관찰되었다(data not shown). Freezing assay는 본엽이 4매정도 전개된 유묘를 4가 유지되는 저온순화실에서 2주간 전처리 한 후, 영하 5에서 2일간 배양한 후 다시 4로 조절하여 1일간 후 처리 한 후, 온실로 옮겨 회복 여부를 관찰하였다(Fig. 6A). 이때, 급격한 온도 변화를 막기 위해 1시간에 1씩 온도가 변하도록 배양기를 프로그래밍하였다. Freezing 처리 후 1주일일 경과했을 때 대조구가 죽은 것에 비해 형질전환체 3개체 모두 생존

Fig. 6 Freezing assay of transgenic rapeseed plants (T_3 lines) harboring the *HvIRIP* gene. (A) Freezing treatment with pre-cold acclimation at 4°C for 2 days. All procedures were carried out under 16h illumination. Wild-type (WT) and *HvIRIP* plants (line 3; 1-3) after 1 week (B) and 4 week (C) of freezing stress.

하는 것이 관찰되었다(Fig. 6B). 그리고 Freezing 처리 후 4주가 경과했을 때 생존한 형질전환체에서 추대가 올라오는 것을 볼 수 있었고, 심지어 화아분화가 정상적으로 이루어져 개화가 되는 것이 관찰되었다(Fig. 6C). 이 결과는 *HvIRIP* 유전자가 유체 형질전환체의 내한성을 증진시킨다는 것을 보여준다.

Proline assay. Proline은 식물이 스트레스에 노출되었을 때 이를 견디고자 만들어내는 아미노산 중 가장 많은 분포를 차지하는 것으로 보고되고 있다(Bates, 1973; Brandts 등, 1977; Liu와 Zhu, 1997; Takagi, 2008). 따라서 Proline 함량은 스트레스 저항성 정도를 측정하는 간접적 지표로 이용되어 오고 있다. 본 실험에서는 식물체가 저온 스트레스를 받는 시간에 따라 Proline 함량 변화를 살펴보았다(Fig. 7). 형질전환체에서의 Proline 함량 변화를 살펴보면 저온에서 1일 경과할 때까지는 큰 변화가

Fig. 7 Measurement of free proline content in 6-leaf stage of rapeseed wild type (WT) and transgenic plant (*HvIRIP*). Plants were incubated at 4°C with 16h light/8h dark photoperiod. Values are reported as mean $\pm$ standard deviation ($n=4$).

Fig. 8 Measurement of total soluble sugar content in 6-leaf stage of rapeseed wild type (WT) and transgenic plant (*HvIRIP*). Plants were incubated at 4°C with 16h light/8h dark photoperiod. Values are reported as mean $\pm$ standard deviation ($n=4$).

없다가 2일째부터 Proline 함량이 증가되기 시작하여 6일째에는 Proline 함량이 급격하게 증가되었다. 한편, 대조구에서도 저온 처리 시간이 길어짐에 따라 Proline 함량이 증가되었지만 형질전환체와 비교해보면 Proline 함량 변화의 폭이 매우 적다는 것을 알 수 있었다. 이 결과를 통해 형질전환체가 저온 스트레스를 잘 견딜 수 있게 저온 저항성이 향상되었음을 알 수 있었다. 지금까지 온도 스트레스에 대한 저항성이 증진된 식물체에서 스트레스 발생시 Proline 함량이 크게 증가되었다는 연구결과가 꾸준히 보고되었다(Xin과 Browse, 1998; Molinari 등, 2007; Lv 등, 2011).

총당함량 측정. 식물 세포내 당함량이 높을수록 세포내 용질농도가 높아져 결과적으로는 빙점(freezing point)이 낮아지게 되어 저온저항성이 강해진다는 다수의 연구결과가 보고되어 왔다(Sakai와 Yoshida, 1968; Kaurin 등, 1981; Guy 등, 1992; Sasaki 등, 1996). 본 실험에서도 저온처리기간에 따른 유체 형질전환체내에서의 총당함량 변화를 살펴보았다(Fig. 8). 대조구와 형질전환체 모두 저온 처리가 길어질수록 총당함량이 증가

Fig. 9 Activities of Reactive Oxygen Species (ROS)-scavenging enzymes in 6-leaf stage of rapeseed wild type (WT) and transgenic plant (*HvIRIP*). Plants were incubated at 4°C with 16h light/8h dark photoperiod. Activities of CAT (A), SOD (B), and ADH (C) were determined. Values are reported as mean standard deviation (n=4). CAT, Catalase; ADH, Alcohol dehydrogenase; SOD, Superoxide dismutase.

되었으며, 저온처리가 2일이 경과될 때까지는 대조구와 형질전환체간의 총당함량의 차이가 없는 것으로 보여진 반면, 저온처리가 3일 경과되면서부터 형질전환체의 총당함량이 대조구보다 증가되는 것을 보였고, 저온처리 6일째에는 형질전환체의 총당함량이 대조구의 총당함량 보다 유의하게 증가되는 것이 관찰되었다. 본 실험을 통해 얻은 연구결과는 기 보고된 연구결과 (Strauss와 Hauser, 1986; Hill 등, 2003; Gusta 등, 2004; Klotke 등, 2004; Couee 등, 2006; Livingston 등, 2006; Rolland 등, 2006; Zhu 등, 2006)와 마찬가지로 저온처리가 지속될 때 식물세포는 스스로를 저온스트레스에서 보호하기 위해서 당을 더 축적하는 것을 알 수 있었고, 당함량과 저온저항성과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

항산화효소 활성 검정. 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 산소원자를 포함한 화학적으로 반응성이 있는 분자를 의미하며, 이러한 분자들은 산소이온 그리고 과산화수소를 포함하고 있는데, 짝지어지지 않는 전자 때문에 반응성이 매우 높다. 환경적 스트레스가 증가하면 활성산소 농도가 빠르게 증가하고 이로 인하여 세포구조가 손상받게 된다. 항산화 효소는 이러한 활성산소의 독성을 감소시켜 결과적으로 세포를 보호하는 기능을 한다고 알려져 있다(Kaneko, 2001). 본 실험에서는 저온처리 기간에 따른 형질전환체내 항산화 효소인 CAT와 SOD의 활성과 ADH 활성을 측정하였다(Fig. 9). 저온처리에 따른 CAT 활성을 측정한 결과(Fig. 9A), 대조구와 형질전환체 모두 저온스트레스 초기부터 CAT 활성이 급격히 감소되는 것을 알 수 있었으며, 대조구의 경우 저온스트레스가 진행됨에 따라 CAT 활성이 계속 감소되어진 반면, 형질전환체에서는 저온스트레스 발생 24시간 이후부터는 CAT 활성이 꾸준히 일정수준을 유지하는 것을 알 수 있었다. 식물 세포내 존재하는 항산화 방어 기전 중 가장 최상위에 있는 SOD의 활성도를 측정한 결과(Fig. 9B), 대조구와 형질전환체 모두 저온스트레스 초기에는 SOD 활성에 큰 변화가 없었으며, 저온스트레스 2일째부터 형질전환체에서의 SOD 활성은 오히려 증가하기 시작한 반면, 대조구에서는 저온스트레스가 지속됨에 따라 SOD 활성이 꾸준히 감소하는 경향을 보였다. ADH는 알코올과 알데히드 또는 알코올과 케톤을 상호교환하는 역할을 하는데, 이는 세포내 독성을 갖는 알코올을 분해함으로써 세포활력에 영향을 주는 효소로 잘 알려져 있다(Christie 등, 1991; Jarillo 등, 1993). 저온스트레스 환경하에서 식물 세포내 발생하는 알코올을 비독성으로 분해하는 ADH 활성을 조사하였다(Fig. 9C). 대조구와 형질전환체 모두에서 저온스트레스가 시작되고 3일이 경과할 때까지는 ADH 활성에 변화가 없었으며, 저온스트레스 7일째에 형질전환체에서의 ADH 활성이 대조구에 비해 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 연구결과를 통해 *HvIRIP* 유전자는 형질전환체의 저온저항성을 향상시켜 결과적으로 저온스트레스가 발생할 때 항산화 효소의 활성을 높이고 독성 물질을 분해시키는 ADH 활성을 높여 세포 활력을 유지시키는 것으로 사료된다.

고찰

본 실험에서는 유채 형질전환체에서 *HvIRIP* 유전자의 전이 및 발현을 확인하였다. 그리고 Freezing assay를 통해 유채 형질전환체가 결빙 후 정상적으로 회복되는 것을 관찰하였다. 또한, Northern 분석을 통해 유채 형질전환체에서 *HvIRIP* 유전자가 저온(4°C) 처리시 강하게 발현되는 것을 알 수 있었다.

Chew 등(2012)은 남극 쉼새풀의 *DalRIP* 유전자가 저온(4°C)에서 처리기간이 길어짐에 따라 유전자 발현이 이와 비례하여 점 점 증가하고 14일째에는 유전자 발현량이 대조구에 비해 1000배 이상 증가한다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 보리의 *HvIRIP* 유전자가 저온(4°C)에서 처리기간이 길어짐에 따라 유전자 발현이 증가하는 것이 관찰되었으며, 유채 형질전환체내에서 *HvIRIP* 유전자가 저온(4°C)에서 2주간 처리되었을 때 유전자가 매우 강하게 발현되는 것이 관찰된 반면, 저온 순화과정 없이 바로 영하(-3°C)로 처리된 앞에서는 *HvIRIP* 유전자의 발현량이 상대적으로 매우 적었다. 이것은 매우 흥미로운 결과인데, 왜냐하면 AFPs에 속하는 *IRIP* 유전자는 Ice binding

motif인 LRRs domain을 가지고 있어 영하 이하의 온도에서도 유전자의 발현이 충분히 잘 일어날 것으로 기대했기 때문이다. 현재까지 AFPs가 식물체내에서 얼음의 결정화 및 얼음의 결정화 속도를 방지하는데 관여하고, 이로 인하여 내동성이 생긴다고 알려져 있다(Hon 등, 1995). 그러나 식물세포가 내동성을 갖는 데에는 복잡한 유전자적 조절 메커니즘이 존재할 거라 추정되며, AFPs가 내한성 또는 내동성에 관여하는 복합 네트워크에 어떻게 관여하는지는 아직까지 정확하게 밝혀지지 않고 있다. 단지, 지금까지 밝혀진 연구결과에 의하면 내동성이 강한 식물은 일반적으로 저온 순화과정(Cold acclimation)동안 영하 이하의 온도에서 견딜 수 있도록 세포막을 안정화시키고, 내한 또는 내동성 관련 유전자들을 작동하여 복합적인 유전자 네트워크가 진행된다고 알려져 있다(Thomashow, 1999).

따라서 우리는 저온(4°C)에 장시간 노출되었을 때 *HvIRIP*의 유전자가 저온스트레스에 어떻게 반응하는지를 살펴본 결과, 대조구에 비해 형질전환체에서 스트레스 저항성에 관여하는 Proline 함량이 급격히 증가되었고, ROS 효소 활성이 시간이 지날수록 점점 증가되는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과들로부터 보리 유래 *HvIRIP* 유전자가 유채 Genome으로 전이된 형질전환체에서 저온에 장시간 노출되는 과정에서 내한성을 증진시키는 것을 알 수 있었다.

초 록

유채는 월동작물로 내한성이 약해 남부지역에서만 재배가 가능하다. 따라서 재배면적 확대 및 안정적 생산성 확보를 위해 내한성 증진 품종 육성이 절실하다. 본 연구에서는 유채의 내한성을 증진시키기 위해 보리에서 유래한 *HvIRIP* 유전자를 *CaMV35S* 프로모터 조절하에서 전신발현되도록 운반체를 제작하였고, 아그로박테리움을 이용하여 유채에 형질전환하였다. Southern 분석을 통해 *HvIRIP* 유전자가 유채 Genome 안으로 전이 되었음을 확인하였다. 또한 Northern 분석을 통해 4°C에서 2주간 처리된 유묘에서 *HvIRIP* 유전자의 발현이 크게 증대되는 것을 알 수 있었다. 본엽 3-4매 전개 유채 형질전환체를 영하 5°C에서 2일간 저온에 노출한 후 회복여부를 조사한 결과, 대조구는 회복하지 못하고 죽은 반면, 형질전환체는 회복이 정상적으로 이루어졌다. 또한 저온스트레스가 진행되는 동안에 스트레스를 극복하는데 필요한 Proline 함량이 형질전환체에서 크게 증대되는 것이 관찰되었다. 이 외에도 저온스트레스 과정 중에 생성되는 활성산소의 독성을 감소시키는 항산화제 효소인 CAT, SOD 그리고 ADH 활성을 측정한 결과, 대조구에 비해 형질전환체에서 그 함량이 현저히 증가됨을 알 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해 *HvIRIP* 유전자가 함유된 유채 형질전환체의 내한성이 증진되었음을 확인하였다.

Keywords 결빙방지단백질 · 내한성 · 유채 · 총당함량 · 프롤린 함량 · 항산화 효소 활성

감사의 글 본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ01115101) 및 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01007502)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Atici Ö and Nalbantoğlu B (2003) Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry* **64**, 1187–96.
- Bates LS (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**, 205–7.
- Booth EJ and Gunstone FD (2004) Rapeseeds and rapeseed oil; agronomy, production, and trade. In *Rapeseed and Canola oil*, Gunstone FD, pp. 1–16. Blackwell publishing Ltd., UK.
- Brandts JF, Brennan M, and Lin LN (1977) Unfolding and refolding occur much faster for a proline-free protein than for most proline-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 4178–81.
- Chew O, Lelean S, John UP, and Spangenberg GC (2012) Cold acclimation induces rapid and dynamic changes in freeze tolerance mechanisms in the cryophile *Deschampsia antarctica* E. Desv. *Plant Cell Environ* **35**, 829–37.
- Chow PS and Landhäusser SM (2004) A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiol* **24**, 1129–36.
- Christie P, Hahn M, and Walbot V (1991) Low-temperature accumulation of alcohol dehydrogenase-1 mRNA and protein activity and Maize and Rice seedlings. *Plant Physiol* **95**, 699–706.
- Couee I, Sulmon C, Gouesbet G, and Amrani AE (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J Exp Bot* **57**, 449–59.
- DeVries AL (1986) Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water. *Methods Enzymol* **127**, 293–303.
- Fei SZ (2008) Perennial ryegrass anti-freeze protein genes enhances freezing tolerance in plants. *Turfgrass Environ Research* **28**, 129–45.
- Gusta LV, Wisniewski M, Nesbitt NT, and Gusta ML (2004) The effect of water, sugars and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiol* **135**, 1642–53.
- Guy CL, Huber JLA, and Huber SC (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol* **27**, 507–28.
- Hightower R, Baden C, Penzes E, Lund P, and Dunsmaur P (1991) Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **17**, 1013–21.
- Hill LM, Morley-Smith ER, and Rawsthorne S (2003) Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiol* **131**, 228–36.
- Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, and Yang DSC (1995) Antifreeze proteins in Winter Rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* **109**, 879–89.
- Jarillo JA, Leyva A, Salinas J, and Martinez-Zapater JM (1993) Low temperature induces the accumulation of alcohol dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a chilling-tolerant plant. *Plant Physiol* **101**, 833–7.
- John UP, Polotnianska RM, Sivakumaran KA, Chew O, Mackin L, and Kuiper MJ (2009) Ice recrystallization inhibition proteins (IRIPs) and freeze tolerance in the cryophilic Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica* E. Desv. *Plant Cell Environ* **32**, 336–48.
- Kankofer M (2001) Antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine retained and not-retained placenta: activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase. *Placenta* **22**, 466–72.
- Kaurin J, Junttila O, and Hansen J (1981) Seasonal changes in frost hardness in cloudberry (*Rubus chamaemorus*) in relation to carbohydrate content with special reference to sucrose. *Physiol Plant* **52**, 310–4.
- Klotke J, Kopka J, Gatzke N, and Heyer AG (2004) Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation-evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant Cell Environ* **27**, 1395–404.
- Knight CA and Duman JG (1986) Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology* **23**, 256–62.

- Liu J and Zhu JK (1997) Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **114**, 591–6.
- Livingston DP, Premakumar R, and Tallury SP (2006) Carbohydrate partitioning between upper and lower regions of the crown in oat and rye during cold acclimation and freezing. *Cryobiology* **52**, 200–8.
- Lv WT, Lin B, Zhang, and Hua XJ (2011) Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seedlings during heat stress. *Plant Physiol* **156**, 1921–33.
- Meyer K, Keil M, and Nalder MJ (1999) A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity. *FEBS Lett* **447**, 171–8.
- Moffatt B, Ewart V, and Eastman A (2006) Cold comfort: plant antifreeze proteins. *Physiol Plant* **126**, 5–16.
- Molinari HBC, Marur CJ, Daros E, de Campos MKF, de Carvalho JFRP, Bessalho JC et al. (2007) Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol Plant* **130**, 218–29.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473–93.
- Roh Kh, Kwak BK, Kim HU, Lee KR, Kim SH, Suh MC et al. (2011) Production of transgenic plants in *Brassica napus* winter cultivar 'Youngsan'. *J Appl Biol Chem* **54**, 26–32.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, and Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 675–709.
- Sakai A and Yoshida S (1968) The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology* **5**, 160–74.
- Sasaki H, Ichimura K, and Oda M (1996) Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of Cabbage seedlings. *Ann Bot* **78**, 365–9.
- Strauss G and Hauser H (1986) Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 2422–6.
- Takagi H (2008) Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 211–23.
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 571–99.
- Tremblay K, Ouellet F, Fournier J, Danyluk J, and Sarhan F (2005) Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals. *Plant Cell Physiol* **46**, 884–91.
- Xin Z and Browse J (1998) *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7799–804.
- Yemm EW and Willis AJ (1954) The estimation of Carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J* **57**, 508–14.
- Zamecnik J and Janacek J (1992) Interaction of antifreeze proteins from cold-hardened cereal seedlings with ice nucleation active bacteria. *Cryobiology* **29**, 718–9.
- Zhu GY, Geuns JMC, Dussert S, Swennen R, and Panis B (2006) Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. *Physiol Plant* **128**, 80–94.